



Набор ИФА для определения ТРИЙОДТИРОНИНА

Кат. № : EIA-1780
Количество : 96
Производитель : DRG (США)

Методика от 26-10-2011
Версия 6.0

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

I. НАЗНАЧЕНИЕ

Для количественного определения концентрации трийодтиронина (Т3) в человеческой сыворотке.

II. ВСТУПЛЕНИЕ

Тироидные железы увеличивают силу и существенное регуляторное влияние на рост, дифференциацию, клеточной метаболизм и основной гормональный баланс, так же как и на обслуживание метаболической активности и развития скелета и системы органов.

Гормоны тироксин Т4 и 3,5,3' трийодтиронин (Т3) циркулируют в кровяном потоке, в основном связываются с протеинами плазмы, тироксин связанном глобулином (ТВГ). Концентрация Т3 меньше чем Т4, но его метаболическая потенциальность значительно выше.

Определения Т3 – важный фактор при диагнозе тироидных болезней. Его измерение имеет раскрытый вариант гипертироидизма в тироидных пациентов с высоким уровнем Т3 и нормальным уровнем Т4. Увеличение Т3 без увеличения Т4 часто предшествует возврату тироидоксикоза в предварительно исследованных пациентов. В других пациентов, эутиреоз показывает нормальный Т3 и субнормальный Т4.

Определение Т3 также используется при мониторинге пациентов, исследуемых на гипертироидизм и пациентов, которые имели прекращающуюся анти-тироидную лекарственную терапию. Это также используется для различения эутиреоза и гипертироидных пациентов.

В женщин, уровень Т3 увеличивается во время беременности, при принятии эстрогенов и гормональной терапии. Когда Т3 параллельно ТВГ увеличивается в аналогии к уровню Т4, это не обозначает изменение тироидного статуса.

III. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

В наборе Т3 ЕІА вторичное антитело (козьиное анти-мышинное IgG), привито к микропланшетным лункам. Измеренное количество сыворотки пациента, известное количество мышинного моноклонального анти-Т3 антитела, и неизменное число Т3, конъюгированное пероксидазой добавляется в лунки. Во время инкубации, мышинное анти-Т3 антитело связывается с вторичным антителом в лунке, Т3 и конъюгированное Т3 конкурирует за ограниченное связанное анти-Т3 антитело. После 60 мин. инкубации при комнатной температуре, лунки промываются 5 раз водой для удаления несвязанного Т3 конъюгата. Потом добавляется раствор ТМБ реагента и инкубируется на 20 мин., в результате развивается голубой окрас. Развития цвета останавливается добавлением Стоп-раствора и абсорбция измеряется спектрофотометром при 450 нм. Интенсивность цвета пропорциональна количеству присутствующего фермента и обратно пропорциональна количеству немаркированных Т3 Стандартов, проанализированных таким же способом, потом вычисляется концентрация Т3 в неизвестном образце.

IV. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Материалы, входящие в состав набора:

1. Планшет с лунками, покрытыми козьими анти-мышинными IgG, 96 лунок.
2. Концентрат ферментного конъюгата (x11), 1,3 мл.
3. Разбавитель ферментного конъюгата, 13 мл.
4. Набор референтных стандартов 0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 и 10,0 нг/мл, 1,0 мл.
5. Реагент антител к Т3, 7 мл.
6. Реагент ТМБ, 11 мл.
7. Стоп-раствор, 11 мл.

V. МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ ПОСТАВКИ

1. Дистиллированная или деионизированная вода.
2. Точные пипетки: 25, 100, 200 мкл и 1 мл.
3. Одноразовые наконечники для пипеток.
4. Микротитривционный луночный ридер со считыванием абсорбции при 450 нм.
5. Промокательная бумага.
6. Графопостроительная бумага.
7. Вortexный миксер или аналог.
8. Материал контроля качества (контрольная сыворотка BioRad Lyphocheck).

VI. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. ВНИМАНИЕ: Этот набор содержит человеческий материал. Исходный материал, используемый для производства этого набора дал отрицательный результат к HBsAg, ВИЧ 1 / 2 и ВГС по утвержденным FDA методикам. Однако, не один метод не может полностью гарантировать отсутствие этих агентов. Таким образом, все человеческие продукты крови, в том числе образцы сыворотки, следует рассматривать как потенциально инфекционные. Обращение с ними должно быть определено соответствующими национальными руководствами или правилами по безопасности в обращении с биологически опасными веществами.
2. Избегать контакта с 1N HCl. Это может вызвать раздражение кожи и ожоги. Если контакт происходит, промыть большим количеством воды и обратиться к врачу если раздражение не проходит.
3. Не использовать реагенты после истечения срока годности и не смешивать или использовать компоненты из наборов с другими серийными номерами.
4. Снимать немедленно крышки на реагенты. Не переставлять крышки.
5. Растворы, содержащие добавки и консерванты, такие как азид натрия, не должны использоваться в ферментативной реакции.
6. Для раскапывания использовать соответствующее устройство.
7. Для диагностического использования in vitro.

VII. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

1. Хранить закрытый набор при 2 - 8°C после получения и когда он не используется, до истечения срока, показанного на этикетке. Срок годности указан на этикетке.
2. Держать планшет в запечатанном пакете с осушителем для минимизации воздействия влажного воздуха.

VIII. СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Кровь должна быть собрана с использованием стандартной техники венопункции, а сыворотка должна быть отделена от красных клеток настолько быстро, насколько целесообразно. Избегать сильно гемолизированных, липемических, или мутных образцов.
2. Плазменные образцы, собранные в пробирки с ЭДТА, гепарином или оксалатом могут влиять на процедуру анализа.
3. Образцы должны быть закрыты и могут храниться до 48 часов при температуре 2 - 8°C до исследования. Образцы, содержащиеся более длительное время (до 6 месяцев) должны быть заморожены только один раз при -20°C до анализа. Размороженные образцы должны быть перевернуты несколько раз до начала исследований.

IX. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Перед использованием довести все реагенты до комнатной температуры (18-25°C).
2. Все реагенты необходимо перемешать путем осторожного переворачивания или покачивания перед использованием. Не провоцировать пенообразование.
3. Подготовка реагента рабочего конъюгата Т3-HRPO: добавить 0,1 мл концентрата конъюгата Т3-HRPO (11x) к 1,0 мл разбавителя конъюгата Т3 (разбавление 1:10) и хорошо смешать. Количество разбавленных конъюгатов зависит от объема анализа. Реагент рабочего конъюгата стабилен при 4°C минимум до 24 часов.

X. ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

1. Ручное раскапывание: рекомендуется использовать не более 32 лунок для выполнения каждой процедуры анализа. Рекомендуется многоканальная пипетка.
2. Автоматизированное раскапывание: в каждой процедуре анализа может использоваться 96-луночный планшет. Однако, рекомендуется завершить пипетирование всех стандартов, образцов и контролей в течение 3 минут.

- Все стандарты, образцы и контроли должны использоваться одновременно в двух экземплярах, соблюдая везде одинаковые условия исследования.
- Рекомендуется проводить считывание лунок в течение 15 минут после добавления стоп-раствора.

6,0	0,992
10,0	0,518

XI. ИНСТРУМЕНТАРИЙ

Микротитрационный луночный ридер с шириной дорожки 10 нм или меньше и диапазоном ОП от 0 до 2 ОП или выше при 450 нм является приемлемым для измерения абсорбции.

XII. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Закрепить нужное количество лунок с антителами в рамку для стрипов. Приготовить лист бумаги для записи идентификации образцов.
- Раскапать по 50 мкл стандартов, образцов и контролей в соответствующие лунки.
- Внести по 50 мкл реагента антител Т3 в каждую лунку. Тщательно перемешивать в течение 30 секунд.**
- Добавить по 100 мкл реагента рабочего конъюгата в каждую лунку. Тщательно перемешивать в течение 30 секунд. **Важно добиться полного перемешивания на этапах 3 и 4.**
- Инкубировать при комнатной температуре (18-25°C) в течение 60 мин.**
- Удалить инкубационную смесь вытряхнув содержимое планшета в контейнер для отходов.**
- Промыть содержимое лунок дистиллированной или деионизированной водой 5 раз и удалить (не использовать проточную воду).
- Резко перевернуть планшет на промокательную бумагу или бумажные полотенца для удаления всех остатков жидкости.**
- Внести по 100 мкл реагента ТМБ в каждую лунку. Аккуратно перемешать в течение 5 секунд.
- Инкубировать при комнатной температуре в темном месте в течение 20 минут.
- Остановить реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп-раствора.
- Аккуратно перемешивать на протяжении 30 секунд. **Убедиться в полном изменении синей окраски на желтую.**
- Измерить оптическую плотность лунок с помощью микропланшетного ридера при 450 нм **на протяжении 15 мин.**

XIII. РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Рассчитать средние значения поглощения (A_{450}) для каждого набора стандарта, контрольных сывороток и образцов в дубле. На бумаге для графиков построить калибровочную кривую, откладывая на вертикальной оси (Y) значение поглощения для каждого референтного стандарта против его концентрации в нг/мл на горизонтальной оси (X).
- С помощью средних значений поглощения для каждого образца по калибровочной кривой определить соответствующую концентрацию Т3 в нг/мл.
- Любые неразбавленные образцы должны быть дальше откорректированы соответствующим коэффициентом разбавления.

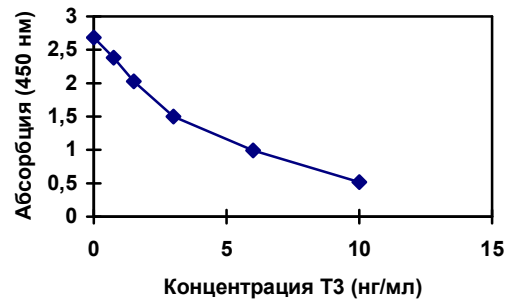
XIV. КАЛИБРОВКА АНАЛИЗА

Стандарты Т3 откалиброваны в сравнении с набором РИА общего Т3 компании «Диагностик Продактс Кормпорейшенз». Точность этой калибровки составляет $100 \pm 5\%$. Таким образом, точность образцов пациентов, анализированных набором ИФА общего Т3 (EIA-1780) может отклоняться на $\pm 5\%$.

A. Пример типичной калибровочной кривой

Результаты типичного оптического считывания плотности стандартов при 450 нм указан на у-оси по отношению к концентрации общего Т3 (нг/мл) показанной на оси x, представлены ниже. **Примечание:** калибровочная кривая представлена только для иллюстрации и не должна использоваться для вычисления неизвестных значений. Каждая лаборатория должна представить свои собственные данные и калибровочную кривую при выполнении каждого анализа. Кроме того, значения поглощения (450 нм) могут быть отличаться в связи с инкубацией при разнице комнатной температуры в разных лабораториях.

Общий Т3 (нг/мл)	Поглощение (450 нм)
0,0	2,685
0,75	2,381
1,5	2,028
3,0	1,502



XV. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Набор ИФА общего Т3 (EIA-1780) был использован в исследовании 41 пациента с гипотиреозом, 64 эутиреоидных, и 49 гипертиреоидных пациентов (как было определено лабораторным анализом больницы) в одном географическом месте. Диапазон, определенный от низшего к высшему значению испытанных образцов пациентов, составил от 0,14 до 6,20 нг/мл и были получены следующие диапазоны:

Гипотиреоз: <0,8 нг/мл
 Эутиреоз: 0,8 - 1,9 нг/мл
 Гипертиреоз: > 1,9 нг/мл

Эти диапазоны соответствуют тем, которые предложены другими реализующими производителями. В целом, уровень общего Т3 сыворотки, как правило, параллельный изменениям в уровнях сыворотки основных связывающих белков, тироксин связывающего глобулина (ТСГ).

Повышенные уровни Т3 могут возникнуть при гипотиреозе лиц, проходящих заменяющую терапию.

Недостаточный прием йода также может вызвать повышение уровня Т3 в сыворотке. Уровни Т3 ниже чем обычно в пуповинной крови, а также имеют тенденцию к понижению в пожилом возрасте. Рекомендуется, чтобы лаборатории определяли значения в соответствии с особенностями географических и популяционных различий, характерных для пациентов, которых они исследуют.

Следующие условия и методы лечения могут изменить ТСГ:

Повышенный ТСГ в сыворотке	Пониженный ТСГ в сыворотке
- Беременность	- Андрогены
- Эстрогенная терапия (включая оральные контрацептивы)	- Кортикостероиды
- Фенотиазины	- Анаболические стероиды
- Вирусный гепатит	- Активная акромегалия
- Острая интермиттирующая порфирия	- Нефритические синдромы
- Микседема	- Стресс, общая слабость или хирургическое воздействие
- Наследственные причины	- Недоедание

XVI. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

(См. данные таблиц в оригинале инструкции).

XVII. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

- Важно: лица, получающие замещающую терапию щитовидной железы такую как трийодтироксовая кислота или трийодтиропионовая кислота, могут дать ошибочно высокие значения Т3 значения в этом исследовании. Многие другие условия, не связанные с заболеванием щитовидной железы, могут привести к аномальным значениям Т3 (см. ожидаемые результаты).
- Надежные и воспроизводимые результаты будут получены когда процедура анализе проводится с полным пониманием инструкции набора и с соблюдением надлежащей лабораторной практики.
- Образцы сыворотки с концентрациями Т3 выше 10 нг/мл должны быть разведены нулевым стандартом, чтобы соответствовать диапазону анализа, и повторно проанализированы. Затем полученное значение должно быть умножено на**

коэффициент разбавления, чтобы получить фактическое значение сыворотки.

4. Желтушные образцы со значением билирубина до 5 мг / дл не влияют на анализ.
5. *Добавленные уровни гемоглобина до 100 мг/дл не показали влияния на значение ТЗ.*
6. Результаты, полученные от использования этого набора должны применяться только как дополнение к другим диагностическим процедурам и информации, располагаемой врачом.
7. Процедура промывки крайне важна. Недостаточная промывка приводит к низкой точности и завышенным считываниям абсорбции.

XVIII. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Надлежащая лабораторная практика требует, чтобы низкий, средний и высокий контрольные образцы (контроль) использовались в каждой калибровочной кривой для проверки качества анализа. Для обеспечения надлежащего выполнения, статистически значимое количество контролей должно анализироваться для определения средних значений и приемлемых диапазонов. Контроли, содержащие азид натрия, не должны использоваться.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 775122
Тел/факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua